



MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

**Instituto de Higiene e Medicina Tropical
Universidade Nova de Lisboa**



Diagnóstico Laboratorial de Micoses Humanas

Métodos Convencionais vs. Métodos Moleculares

Eduardo Esperança de Carvalho



MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

**Instituto de Higiene e Medicina Tropical
Universidade Nova de Lisboa**



Diagnóstico Laboratorial de Micoses Humanas

Métodos Convencionais vs. Métodos Moleculares

Eduardo Esperança de Carvalho

Tese apresentada para a obtenção do grau de

Mestre em Ciências Biomédicas

Orientador: Investigadora Doutora Maria da Luz Martins

2008

Agradecimentos

À Investigadora Doutora Maria da Luz Martins, por me ter proporcionado um ano de ensino na área da Micologia Médica e me ter admitido tão amigavelmente no seu laboratório, o que facilitou bastante a elaboração e concretização deste trabalho.

À Dr^a Graça Trigueiros do Laboratório de Análises Clínicas Dr Joaquim Chaves e ao Dr João Lago do Serviço de Análises Clínicas do Hospital Militar de Belém (HMB) pelo contributo que deram a este trabalho ao facultarem amostras biológicas.

À Direcção Nacional da Polícia de Segurança Pública (PSP) e ao Corpo de Intervenção da PSP por terem permitido a realização de colheitas aos agentes dessa Unidade.

Ao Tenente Coronel Médico Dr. Paulo Lúcio, Director do HMB e ao Tenente Coronel Farmacêutico Dr. Manuel Silva, Chefe do Serviço de Análises Clínicas do HMB, por me terem proporcionado o ambiente necessário ao estudo e consolidação de conhecimentos em Micologia Médica.

À Ana Sofia, pela ajuda no laboratório e pela amizade que sempre revelou.

À minha família, por me terem apoiado novamente em mais uma etapa importante da minha vida.

À Susana, por estar a meu lado em todos os momentos da minha vida.

Ao meu avô, João Matias Esperança, por toda a ajuda, amizade, carinho, compreensão e dedicação que revelou comigo ao longo da sua vida.

Muito obrigado a todos

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. Introdução	1
1.2. Características gerais dos fungos	2
1.3. Taxonomia	3
1.4. Distribuição Geográfica	5
1.5. Distribuição na Natureza	6
1.6. Epidemiologia	6
1.7. Infecções Nosocomiais	7
1.8. Emergência de novos fungos patogénicos	7
1.9. Tipos de micoses	8
2. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL EM MICOLOGIA MÉDICA	10
2.1. Colheita e processamento de amostras de material biológico	10
2.2. Exame Micológico	16
2.2.1. Exame directo	16
2.2.2. Meios de cultura e seu processamento	18
2.2.3. Identificação cultural	20
2.2.3.1. Identificação de leveduras	20
2.2.3.2. Identificação de fungos filamentosos	23
2.3. Conservação de fungos	24
2.4. Objectivos do estudo e plano da dissertação	26
3. DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES POR LEVEDURAS DO GÉNERO <i>Candida</i>	29
3.1. Candidoses	30
3.1.1. Taxonomia das leveduras do género <i>Candida</i>	30
3.1.2. Ecologia e Epidemiologia	31
3.1.3. Manifestações Clínicas	31
3.2. Métodos tradicionais para diagnóstico e identificação de leveduras do género <i>Candida</i>	32
3.2.1. Identificação de <i>Candida albicans</i>	34
3.2.2. Matérias e métodos	36
3.2.3. Resultados e Discussão	39
3.3. Métodos moleculares para diagnóstico e identificação de leveduras do género <i>Candida</i>	41
3.3.1. Matérias e métodos	42
3.3.2. Resultados e Discussão	45

4. ESTUDO DA SENSIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS	51
4.1. Derivados azólicos	52
4.1.1 Farmacocinética e mecanismo de acção dos derivados azólicos: Fluconazol e Voriconazol	53
4.1.2. Mecanismos de resistência aos antifúngicos azólicos	55
4.2. Métodos para o estudo da sensibilidade aos antifúngicos	56
4.3. Materiais e Métodos	58
4.3.1. Método de difusão em disco	56
4.4. Resultados e Discussão	62
5. ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DE ONICOMICOSSES E <i>TINEA PEDIS</i> EM AGENTES DO CORPO DE INTERVENÇÃO DA POLÍCIA DE SEGURANÇA PÚBLICA, EM LISBOA	64
5.1. Breve resenha histórica sobre dermatofitoses	64
5.2. Epidemiologia	65
5.3. Patogenicidade	68
5.4. Manifestações clínicas	69
5.5. Material e métodos	71
5.5.1. Amostragem	71
5.5.2. Colheita	71
5.5.3. Tratamento laboratorial	72
5.5.3.1. Exame microscópico directo	73
5.5.3.2. Exame cultural	73
5.5.4. Resultados e discussão	77
6. CONCLUSÃO	81
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
ANEXO I (tabela 8)	94
ANEXO II (tabela 9)	102
ANEXO III (tabela 10)	103
ANEXO IV (tabela 11)	108

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Exemplos de exames directos em KOH onde se podem observar hifas de fungos filamentosos (à esquerda (200x) e artrosporos (à direita (600x)).....	17
Figura 2	Preparação microscópica relativa ao teste da blastese, onde se observam células leveduriformes de <i>Candida albicans</i> a formar tubo germinativo (600x).....	22
Figura 3	Formação de tubos germinativos <i>Candida albicans</i> no teste da blastese, resultado positivo (à esquerda) e de um pseudofilamento de um isolado de <i>Candida</i> não- <i>albicans</i> incubado durante mais de 3h nas condições do teste, resultado falso-positivo (à direita) (ampliação 600x)	35
Figura 4	Esquema representativo da metodologia usada neste trabalho para identificar as diferentes leveduras isoladas a partir de infecções humanas.....	37
Figura 5	Galeria de identificação ID 32C	39
Figura 6	Esquema representativo da organização dos genes ribossómicos e dos primers universais e primers específicos para as diferentes espécies de <i>Candida</i> ⁴	43
Figura 7	Esquema representativo das bandas esperadas após amplificação por <i>PCR multiplex</i>	44
Figura 8	Identificação molecular de <i>C. glabrata</i> (posição 2 e 4), <i>C. albicans</i> (posição 3, 5, 6, 7, 8, 9 e 12), <i>C. tropicalis</i> (posição 10), e <i>C. dubliniensis</i> (posição 11).....	47
Figura 9	Identificação molecular de <i>C. glabrata</i> (posição 2), <i>C. krusei</i> (posição 3), e <i>C. albicans</i> (posição 4,5 e 6).....	47
Figura 10	Identificação molecular de <i>C. albicans</i> (posição 2), <i>C. lusitanae</i> (posição 3), <i>C. glabrata</i> (posição 4), <i>C. tropicalis</i> (posição 5) e <i>C. krusei</i> (posição 6).....	48
Figura 11	Identificação molecular de <i>C. parapsilosis</i> (posição 2, 3 e 12), <i>C. lusitanae</i> (posição 4 e 9), <i>C. glabrata</i> (posição 5, 6, 7, 8 e 10), <i>C. tropicalis</i> (posição 5) e <i>C. albicans</i> (posição 11).....	48
Figura 12	Fórmula estrutural química do fuconazol (à esquerda) e do voriconazol (à direita).....	53
Figura 13	Esquema representativo do modo de inoculação das placas para o método de difusão em disco.....	59
Figura 14	Teste de sensibilidade ao Fluconazol e ao Voriconazol pelo método de difusão em disco, onde se observam um isolado sensível ao Fluconazol (à esquerda) e um isolado resistente ao Fluconazol (à direita).....	62
Figura 15	Aspecto microscópico, com ampliação de 600x, de cadeias de artrosporos (à esquerda) e de hifa (à direita) presente numa amostra de descamação plantar de um indivíduo com tinea pedis que participou no estudo epidemiológico.....	73
Figura 16	Aspecto macroscópico do verso (à esquerda) e reverso (à direita) de uma cultura de <i>T. rubrum</i> em meio PDA, isolado a partir de amostra recolhida em indivíduo com lesão.....	74
Figura 17	Aspecto macroscópico do verso (à esquerda) e reverso (à direita) de cultura de <i>T. rubrum</i> em meio de PDA, isolado a partir de amostra recolhida em indivíduo com lesão	75

Figura 18	Aspecto micromorfológico característico de <i>T. rubrum</i> ., isolado a partir de indivíduo com lesão (600x)	75
Figura 19	Exame microscópico cultural (600x) de uma cultura de <i>T. mentagrophytes</i> , isolado a partir de um indivíduo com lesão aparente, onde se observa a presença de hifas em espiral	77

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Avaliação da qualidade das identificações pelo sistema ID 32C.....	38
Tabela 2	Sequência oligonucleótida dos primers universais e específicos para as diferentes espécies de leveduras do género <i>Candida</i> e dimensão dos fragmentos resultantes da reacção de amplificação por PCR com os primers utilizados.....	43
Tabela 3	Concentração de cada primer utilizada na mistura da reacção de <i>PCR multiplex</i>	44
Tabela 4	Mistura reaccional usada nas reacções de <i>PCR multiplex</i> para a identificação de isolados clínicos do género <i>Candida</i>	45
Tabela 5	Critérios de interpretação dos halos de inibição e concentrações mínimas inibitórias (CMI) equivalentes para o fluconazol e voriconazol	61
Tabela 6	Intervalos dos diâmetros dos halos de inibição recomendados para as estirpes de referência no controlo de qualidade	61
Tabela 7	Percentagem de isolados sensíveis e resistentes em cada espécie, para o antifúngico fluconazol	63
Tabela 8	Identificação de isolados de leveduras por métodos tradicionais	94
Tabela 9	Resultados da identificação dos isolados de leveduras do género <i>Candida</i> processados por métodos tradicionais (teste da blastese, Bichrolatex ou API ID 32C) e métodos moleculares (<i>PCR multiplex</i>)	102
Tabela 10	Resultados do estudo da sensibilidade aos antifúngicos fluconazol e voriconazol, pelo método de difusão em disco	108
Tabela 11	Produtos biológicos colhidos e resultado do exame micológico nos indivíduos rastreados do Corpo Intervenção PSP	115

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Percentagem de isolados sensíveis e resistentes em cada espécie, para o antifúngico fluconazol	63
Gráfico 2	Indivíduos infectados com <i>tinea pedis</i> e/ou <i>tinea unguium</i> em relação ao total de indivíduos rastreados	78
Gráfico 3	Indivíduos infectados com e sem lesão aparente (valores percentuais).....	78
Gráfico 4	Percentagem de indivíduos com exame directo negativo e cultural positivo vs indivíduos com exame directo positivo e exame cultural positivo.....	79
Gráfico 5	Percentagem de indivíduos infectados com cada uma das espécies isoladas	79

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
CDC	Center for Disease Control
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleótido-trifosfato
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EtBb	Brometo de Etídio
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer Regions</i>
KOH	Hidróxido de Potássio
NaCl	Cloreto de Sódio
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
Pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDA	Potato Dextrose Agar
R	Resistente
RNA	Ácido Ribonucleico
S	Sensível
SDD	Sensível Dependente da Dose
SIDA	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
sp.	Espécie
spp.	Espécies
TBE	Tampão Tris, Ácido Bórico e EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
UV	Luz Ultravioleta
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana

Resumo

Ao longo do último século, os métodos de diagnóstico e terapêutica têm contribuído para alterar a história natural das doenças infecciosas, nomeadamente as de origem fúngica. Para tal, muito tem contribuído um melhor diagnóstico laboratorial, permitindo identificar a espécie responsável pela infecção e orientar para o tratamento mais eficaz na sua cura.

O objectivo principal deste trabalho foi a aquisição de conhecimentos sobre as técnicas laboratoriais mais adequadas para um correcto diagnóstico micológico, principalmente na identificação e caracterização de leveduras do género *Candida* e de dermatofitoses. Para tal, ao longo de um ano, foram analisadas amostras provenientes de indivíduos com diagnóstico clínico de micose.

Relativamente às micoses oportunistas induzidas por leveduras do género *Candida*, foi feito o diagnóstico laboratorial de um elevado número de casos de candidose usando métodos tradicionais e métodos moleculares. Os resultados obtidos por ambos os métodos foram comparados, tendo-se concluído que os segundos são mais rápidos e igualmente seguros na correcta identificação das espécies. Contudo, apresentam mais especificidades ao nível do equipamento e material de laboratório necessário.

Para as leveduras do género *Candida*, foi ainda efectuado um teste de sensibilidade aos antifúngicos fluconazol e voriconazol, tendo-se verificado elevada sensibilidade dos isolados para ambos os fármacos. Verificou-se ainda que os isolados resistentes *in vitro* ao fluconazol foram sensíveis ao voriconazol.

Foi ainda realizado um estudo epidemiológico de onicomicoses e *Tinea Pedis* em agentes do Corpo de Intervenção da Polícia de Segurança Pública, tendo-se aferido que estas infecções podem agravar um problema de saúde pública pelo seu elevado poder contagioso, principalmente em áreas de fácil dispersão de fungo, como são os balneários ou os dormitórios frequentados diariamente por várias centenas de indivíduos.

Com este trabalho concluiu-se que a identificação laboratorial do fungo responsável pela infecção é um passo fundamental para o adequado diagnóstico clínico e consequente esquema terapêutico. Assim e apesar da tendência dos últimos anos indiciar a orientação para o uso mais intensivo de técnicas moleculares no diagnóstico micológico, estas não deverão ser usadas isoladamente dos métodos tradicionais, mas sim como técnicas complementares de diagnóstico, pois onde umas podem falhar, as outras podem responder adequadamente.

Abstract

Along the last century, the methods of diagnosis and therapeutics have been contributing to modify the natural history of the infectious diseases, namely fungic infections. Much has been contributing to a better diagnostic, allowing to identify the sort responsible for the infection and to orientate for the most efficient treatment in his cure.

The principal goal of this work was the acquisition of knowledges on the laboratorial techniques, more adapted for a correct diagnosis in miology, in the identification and characterization of yeasts of the type *Candida* and dermatofitosys. Along one year, samples originating from individuals were analysed with clinical diagnosis of mycosis.

Face to the mycosis induced by yeasts of the type *Candida*, was done the laboratorial diagnosis from a number of cases of candidose using traditional methods and molecular methods. The results obtained by both methods were compared, when it ended that the second ones are quicker and equally insurances in the correct identification of the sorts.

For the yeasts of the type *Candida*, was still effectuated a test of sensibility to the fluconazol and voriconazol, when elevated sensibility of the isolated ones happened for both drugs. One checked still that the isolated resistant *in vitro* to fluconazol were sensitive to voriconazol.

A epidemiologic study was fulfilled on onicomicoses and *Tinea Pedis* in agents of the Body of Intervention of the Police officer of Public Security, when it checked that these infections can aggravate a problem of public health for his elevated contagious power, principally in areas of easy dispersal of fungus, since they are the bathing resorts or the bedrooms frequented daily by several hundreds of individuals.

With this work it was still possible to end that the laboratorial identification of the fungus responsible for the infection is a basic step for the appropriate clinical diagnosis. In spite of the tendency of the last years to use more intensive of molecular techniques in the diagnosis, these will

not have to be used separately of the traditional techniques, but yes like complementary techniques of diagnosis, so it happened what, where a few can fail, others can answer appropriately.